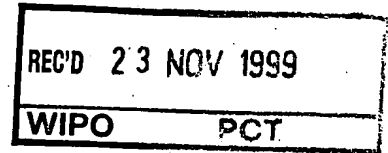


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

02. Nov. 1999

EP 99 / 0631 b

ESU

**Bescheinigung**

Die Herren Dr. Fritz Stähler in Weinheim/Deutschland, Cord Friedrich Stähler in Stuttgart/Deutschland, Peer Friedrich Stähler in Frankfurt am Main/Deutschland und Hans Lindner in Stuttgart/Deutschland haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Träger für Analytbestimmungsverfahren und Verfahren zur Herstellung des Trägers"

am 28. August 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/48 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 14. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt**Der Präsident**

Im Auftrag

Weihmayr

Aktenzeichen: 198 39 256.7

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

PATENTANWÄLTE

European Patent Attorneys
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. **H. WEICKMANN**
DIPL.-ING. **F. A. WEICKMANN**
DIPL.-CHEM. **B. HUBER**
DR.-ING. **H. LISKA**
DIPL.-PHYS. DR. **J. PRECHTEL**
DIPL.-CHEM. DR. **B. BÖHM**
DIPL.-CHEM. DR. **W. WEISS**
DIPL.-PHYS. DR. **J. TIESMEYER**
DIPL.-PHYS. DR. **M. HERZOG**

POSTFACH 860 820
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0
TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68
eMail weickmann@compuserve.com

28. Aug. 1998

Unser Zeichen:
19134P DE/Tlct

Anmelder:

Dr. Fritz Stähler, Gässelweg 15, D-69469 Weinheim

Cord Friedrich Stähler, Kelterstraße 35, D-70199 Stuttgart

Peer Friedrich Stähler, Martin-May-Str. 16, D-60594 Frankfurt

Hans Lindner, Vierreichweg 29, D-70569 Stuttgart

eingetragen



Träger für Analytbestimmungsverfahren und Verfahren zur
Herstellung des Trägers

Träger für Analytbestimmungsverfahren und Verfahren zur Herstellung des Trägers

Beschreibung

5

1 Anwendungsgebiet der Erfindung

1.1 Hintergrund

10

Für die Grundlagenforschung in den Biowissenschaften und für die medizinische Diagnostik sowie einige andere Disziplinen ist die präzise Detektion biologisch relevanter Moleküle in definiertem Untersuchungsmaterial von herausragender Bedeutung. Dabei liegt die genetische Information in Form einer enormen Vielfalt von unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen vor, der DNA (desoxyribonucleic acid). Die Realisation dieser Information führt über die Herstellung von Abschriften der DNA in RNA (ribonucleic acid) meist zur Synthese von Proteinen, die ihrerseits häufig an biochemischen Reaktionen beteiligt sind. Sekundär werden dadurch zahlreiche organische, teils niedermolekulare, Verbindungen auf- und abgebaut.

15

20

25

30

Die Detektion von bestimmten Nukleinsäuren und die Bestimmung der Abfolge der vier Basen in der Kette der Nukleotide (Sequenzierung) liefert wertvolle Daten für Forschung und angewandte Medizin. In der Medizin konnte in stark zunehmendem Masse durch die in vitro-Diagnostik (IVD) ein Instrumentarium zur Bestimmung wichtiger Patientenparameter entwickelt und dem behandelnden Arzt zur Verfügung gestellt werden. Für viele Erkrankungen wäre eine Diagnose zu einem ausreichend frühen Zeitpunkt ohne dieses Instrumentarium nicht möglich. Hier hat sich die genetische Analyse als wichtiges neues Verfahren etabliert (z.B. Infektionskrankheiten wie HIV und HBV, genetische Prädisposition für bestimmte Krebsarten oder andere Erkrankungen, Forensik). In enger

Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Forschung konnten die molekularen Ursachen und (pathologischen) Zusammenhänge einiger Krankheitsbilder bis auf die Ebene der genetischen Information aufgeklärt werden. Diese Entwicklung steht allerdings noch am Anfang, und gerade für die Umsetzung in Therapiestrategien bedarf es stark intensivierter Anstrengungen. Insgesamt haben die Genomwissenschaften und die damit verbundene Nukleinsäureanalytik sowohl zum Verständnis der molekularen Grundlagen des Lebens als auch zur Aufklärung sehr komplexer Krankheitsbilder und pathologischer Vorgänge enorme Beiträge geleistet. Darüber hinaus liefert die genetische bzw. gentechnische Analyse bereits heute ein breites diagnostisches Methodenspektrum.

Die weitere Entwicklung in der medizinischen Versorgung wird durch die Explosion der Kosten belastet, die mit entsprechend aufwendigen Verfahren verbunden sind. Hier muß nicht nur auf die Realisation der Möglichkeiten an diagnostischem und therapeutischem Nutzen gedrängt, sondern auch eine Integration in ein tragfähiges, finanzierbares Gesundheitssystem vorangetrieben werden.

Eine Anwendung entsprechender Technologien in der Forschung kann ebenfalls nur dann in breitem Umfang und auch im akademischen Bereich erfolgen, wenn die damit verbundenen Kosten reduziert werden.

1.2 Bedarf

Die Entwicklung der Genomwissenschaften und die Entschlüsselung des Erbgutes stehen noch am Anfang der Entwicklung, ebenso die Realisation des diagnostischen Potentials einer genetischen bzw. gentechnischen Analyse. Die bisher etablierten Verfahren sind meist arbeitsaufwendig und relativ ineffizient, was sich in Kosten und Kapazität z.B. an Informationsgewinn niederschlägt. Wichtigste Neuerung ist die Entwicklung von sog. Oligonukleotid-Arrays, bei denen eine sehr große Anzahl von relativ

kurzen Oligonukleotiden definierter Sequenz auf einer festen Matrix (meist Silizium) angekoppelt sind und dadurch für eine parallele Hybridisierung komplementärer Sequenzen im Untersuchungsgut zur Verfügung stehen. Die aufwendige Herstellung und der hohe Preis lassen die Vermarktung als Massenprodukt zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber nicht zu.

1.3 Anwendungsfelder

* in vitro Diagnostik und klinische Diagnostik

Durch deutlich preiswertere Systeme soll die Anwendung in der Routine möglich werden, z.B. für

- Infektionskrankheiten (HIV, HBV etc.) und deren Subtypen,
- Onkologie (Tumorfrüherkennung, Tumorklassifizierung, z.B. Typ und Status),
- genetische Prädisposition

* biologische Grundlagenforschung, insbesondere Genomik

Erfassung von sehr vielen Meßpunkten im untersuchten System, z.B. alle exprimierten Gene; daraus wird sich ein enormer Erkenntnisgewinn in der biologischen Grundlagenforschung (Entwicklungsbiologie, Stammzellkultur, Tissue-engineering, Transplantationsmedizin, Regeneration) ableiten, der auch zu wichtigen Durchbrüchen in der Biomedizin und zu entsprechenden Anwendungen führen wird.

* Forensik

Wie für die Verwendung von DNA GenChips der Firma Affymetrix gezeigt wurde (Science 280:1077-1082) kann durch entsprechende biochemische Rahmenbedingungen in der Hybridisierung zwischen Punktmutationen in der Basenabfolge unterschieden werden. Mit dem hier beschriebenen System ist damit ein breit angelegtes Screening möglich.

* Lebensmittelanalytik

Durch diese Erfindung sollte das rasche, kosteneffektive Analysieren von Lebensmitteln z.B. auf das Vorhandensein bestimmter Gene hin möglich werden.

* Screening von medizinischen Produkten

5 Die Herstellung z.B. von Blutpräparaten ist immer noch mit einem hohen Aufwand für die Sicherheitsvorkehrungen zur Reinheit verbunden. Ein zeit- und kosteneffektives Screening solcher Proben wird mit dieser Erfindung möglich werden, um z.B. eine Kontamination mit infektiösem Material zu verhindern (HIV, HBV etc).

10

2 Stand der Technik

Bei BioChips handelt es sich um miniaturisierte hybride Funktionselemente mit biologischen und technischen Komponenten, z.B. an der
15 Oberfläche immobilisierte Biomaterialien, die als spezifische Interaktionspartner dienen können (z.B. DNA-Oligonukleotide) und eine Silizium-Matrix. Meist sind diese Funktionselemente in Reihen und Spalten angeordnet, man spricht dann von BioChip arrays. Da tausende von biochemischen Funktionselementen auf dem BioChip angeordnet sein können,
20 müssen diese mit mikrotechnischen Methoden hergestellt werden.

Vor allem in den USA wird die Entwicklung von miniaturisierten BioChips mit enormen Mitteln vorangetrieben. Die wichtigsten in diesem Umfeld
tätigen Firmen sind im folgenden aufgelistet:

25

Affymetrix, Beckman Instruments, Blue Chip Biosystems, Caliper Technologies, Cura-Gen, Genometrix, Gene Trace Systems, Hyseq, Incyte Pharmaceuticals, Molecular Tool, Nanogen, Pharmacia, Synteni, Third Wave Technologies, Vysis.

30

Bisher bekannte BioChips lassen sich nach folgenden Kriterien klassifizieren:

*** Nachweisprinzip:**

- Chromatographische Verfahren
- Interaktion von Analyten mit fester Phase, meist immobilisierter Interaktionspartner (z.B. Hybridisierung von Nukleinsäuren an DNA-Oligonukleotide).

*** Detektionsverfahren (optisch, elektrisch).**

- * Markerbasiert (z.B. Absorption, Fluoreszenz oder Lumineszenz) oder markerfreie Nachweisverfahren (Lichterzeugung zum Reaktionsnachweis).

*** Zuordnung des Analyten zu seinem Träger [Festphase]**

(ARRAY mit mehr als einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger oder SINGLE mit nur einem immobilisierten Interaktionspartner pro Träger).

*** Herstellungsverfahren (z.B. Oligonukleotide direkt auf dem BioChip**

lichtaktiviert synthetisieren, fertig synthetisierte Oligonukleotide spotten, Beads oder Tubes beschichten).

* Trägerarten (Glas-Chips, Kunststoff-Chips, Mikrotiterplatten, Tubes oder Beads).

* Präsentation zur Detektion (seriell, parallel).

* Optische Detektion (seriell im Scanner oder parallel mit einer CCD-Kamera).

Unter den aufgeführten Firmen verwendet lediglich Affymetrix das Prinzip der Photolithographie für eine "high density" Erzeugung von DNA-Arrays auf einer planaren Oberfläche, wodurch sie die Parallelisierung der Detektion von Oligo-Sequenzen mit Abstand weitesten voran getrieben haben.

GenChip von

Affymetrix Inc., Santa Clara, Kalifornien:

* Neuartige in situ Synthese von DNA-Oligonukleotiden auf planaren Chips in hoher Dichte (Juli 98: bis 64.000 unterschiedliche Oligos auf 1 cm²).

5 * Herstellungsverfahren basiert auf der in der Halbleiter-Industrie verwendeten und optimierten Photolithographie, wobei eine lichtaktivierbare Bindung von Oligos an die Chipoberfläche, sowie an bereits vorhandene Oligos, verwendet wird.

* Herstellungsdauer beträgt aufgrund einer Vielzahl von Verfahrensschritten mehrere Stunden.

10 * Serielle optische Detektion des planaren Chips in einem Fluorescensscanner.

* Hybridisierungsdauer der Probe auf einem Chip ca. 1.5 Stunden.

* Erste Produkte (Sequenzierchip für Tumormarker p53 Exons 2-11, Brustkrebsgen BRCA1 Exon 11, HIV GeneChip).

15 * Kosten zur Zeit im Bereich mehrere hundert Dollar für einen GenChip, dazu wird noch die Detektionseinheit benötigt.

3 Gegenstand der Erfindung und damit gelöste Aufgabe

20 Gegenstand der Erfindung ist ein Träger (nachstehend auch als BioChip oder FCC-Chip bezeichnet) für Analytbestimmungsverfahren, umfassend eine Vielzahl von Kanälen, insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist.

25 Vorzugsweise enthält der Träger definierte Flächenbereiche mit jeweils gleichen Rezeptorspezies.

Die Kanäle sind vorzugsweise auf mindestens einer Trägeroberfläche angeordnet.

30

Die Rezeptoren sind insbesondere aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloge ausgewählt.

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Trägers der vorstehend genannten Art, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend eine Vielzahl von Kanälen;
- b) Leiten von Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder Rezeptorbausteinen durch die Kanäle des Trägerkörpers und
- c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren oder Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in den Kanälen.

Das Immobilisieren erfolgt gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform durch Belichtung.

Vorzugsweise erfolgt der Aufbau des Rezeptors am Trägerkörper durch mehrere aufeinanderfolgende Immobilisierungsschritte von Rezeptorbausteinen.

Der Träger nach der Erfindung findet vorzugsweise in einem Verfahren zur Bestimmung von Analyten in einer biologischen Probe Verwendung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein neuer "BioChip" als Basis für die Verwendung der photolithographischen Synthese einzelner Basen (G, A, C und T) oder ganzer Oligonukleotide (Basen- Sequenzen) zur Bildung einer hochparallelen, -planaren und -dichten Anordnung (Array) dieser Oligonukleotide in einer festen Trägermatrix (Chip).

Der neue BioChip, der "Fraktal Capillary Chip - FCC", besteht aus einer Struktur aus Mikrokanälen (Kapillaren) in einem durchsichtigen, flachen Körper. Die flüssigen Einsatzstoffe werden bei der DNA- Chipsynthese, durch die Kapillaren im Chip geführt und binden, lokal lichtaktiviert, an den Kapillarwänden. Damit werden die technischen Voraussetzungen für

eine schnelle, effiziente und damit kostengünstige Herstellung von BioChips geschaffen, was den breiten Einsatz dieser BioChips ermöglichen wird. Dichte und Parallelität liegen in der gleichen Größenordnung wie bei Konkurrenzprodukten (z.B. GenChip von Affymetrix), mit mehreren hunderttausend definierten Oligonukleotiden auf einem Träger. Der Vorteil der neuen Chips liegt in den günstigeren physiko-chemischen Eigenschaften der Strömungs- und Benetzungsvorgänge in den Kapillaren im Vergleich mit einer einheitlichen Oberfläche.

Die Chip- Produktion besteht aus der Erzeugung des Trägerkörpers aus einem geeigneten, lichtdurchlässigen Material sowie dem biochemischen Beschichtungsvorgang (coating) der Wände der einzelnen Kapillaren so daß anschließend die Oligonukleotide in den Kapillaren synthetisiert werden können (labeln). Hierbei werden in den einzelnen Kapillaren im Chip, mittels Photoaktivierung durch eine geeignete Lichtquelle einzelne Basen oder ganze Basen- Sequenzen (Oligos) ortsspezifisch angelagert. Dadurch entstehen in jeder Kapillare eine Vielzahl an Meßpunkten (spezifische Bindungs- bzw. Hybridisierungsstellen), wobei jeder Meßpunkt aufgrund seiner individuellen Basen-Sequenz-Kombination für die Hybridisierung und anschließende Detektion eines spezifischen DNA-Fragmentes dient. Die Meßpunkte sind in einer Dimension des planaren Chips durch die Wände der Kapillaren von einander getrennt und entlang der einzelnen Kapillaren wird zwischen zwei benachbarten Meßpunkten bei der photoaktivierten Bindung ein entsprechender Freiraum gelassen. Es entsteht ein hoch paralleler, hoch integrierter Meßpunkt-Array (DNA-Chip-Array). Aufgrund der Möglichkeit des Multiplexens von Oligo-Sequenzen und parallelen Kapillaren (Details siehe Kapitel 5) ist eine Reduktion der Herstellzeiten auf 1/4 bei der Verwendung einfacher Basen, 1/8 bei Dinukleotiden und auf 1/16 bei Trinukleotiden durch entsprechendes Multiplexing der Oligos (Einsatzstoffe) und der zu benetzenden Kapillaren möglich. Damit wird

auch eine flexible Anpassung an Kundenwünsche, der
"massgeschneiderte" BioChip, möglich.

Für die Analyse wird das Untersuchungsmaterial (z.B. DNA, RNA in
Lösung) durch die Kapillaren geführt und erhält Gelegenheit zur
Hybridisierung an komplementäre Stränge, sofern diese vorhanden sind.
Zur Detektion und Auswertung der jeweiligen DNA-Hybridisierung
werden hochauflösende, parallele CCD- Chips verwendet. Das Lichtsignal
wird durch ein geeignetes Nachweisverfahren (Stand der Technik)
erzeugt. Es sind aber auch neue Detektionsverfahren anwendbar. Bei der
Detektion kann auf optisch abbildende Linsensysteme verzichtet werden,
wenn die Größe der Kapillaren so gewählt wird, daß jeder Meßpunkt eine
ausreichende Anzahl Pixelelemente des Farb-CCD-Chips überdeckt. Durch
diese direkte Nutzung (keine Optik) hoch paralleler CCD-Matrix Chips mit
einer großen Anzahl (derzeit 8 Mio. Farbpixel pro 1 cm²; Stand der
Forschung: 30 Mio. Farbpixel pro 1 cm²) an Pixeln (optischen Sensoren)
ist es möglich eine Vielzahl von Lichtsignalen parallel zu detektieren
(siehe BioScanner der Firma Genometrix). Damit wird versucht, auch bei
der Detektionseinheit statt teurer optischer Anordnungen auf ein in
großer Stückzahl und zu niedrigen Preis gefertigtes High-Tech Produkt
zurückzugreifen.

Die Erfindung deckt somit folgende Anforderungen in der klinischen
DNA-Diagnostik ab:

- * Eine Vielzahl an simultan bestimmbar DNA- Sequenzen (erreicht
durch hoch integrierte, miniaturisierte FC-Chips und eine
hochauflösende optische Detektion).
- * Kostengünstige Tests (Multiplexing in der Produktion [s.o.], billige
"Disposable"- Chips zum Beispiel aus Spritzguß, einer schnellen Synthese
bei der Produktion und eine schnelle Hybridisierung bei der Analyse
aufgrund kleinerer Volumina und günstiger Benetzungsvorgänge,

der Reduktion der Einsatzstoffe durch die Strömungsgeometrie des Chips etc.).

- * Schnelle Auswertung (erreicht durch die parallele optische Auswertung in planarer Anordnung [DNA-Chip Array]).

5 * Kostengünstiges Analysesystem (erreicht durch den Verzicht auf teure, mikrosystemtechnische und optische Komponenten).

- * Sicherstellung der Qualität sowohl bei der Produktion, als auch bei der Analyse (erreicht durch definierte Strömungsvorgänge im Chip).

10 Die Verwendung der Photoaktivierung von chemischen Reaktionen im Bereich der DNA-Chip-Synthese wird erst in Kombination mit der Technologieplattform des "Fraktal Capillary Chip - FCC" zum Durchbruch kommen, da hierdurch die Produktionskosten für einen einzelnen BioChip, bei gleichzeitiger Qualitätsverbesserung, um den Faktor 10-100 reduziert werden können. Dadurch wird zum ersten mal eine kostengünstige, massiv parallele, hoch integrierte und gleichzeitig einfach miniaturisier- und automatisierbare DNA-Chip-Technologie zur Verfügung gestellt.

4 Grundzüge des Lösungsweges

20

Der prinzipielle Lösungsweg in diesem System basiert auf der biochemischen Synthese von Oligos an die Oberflächen einer Vielzahl von Kapillarwänden. Diese Kapillaren sind in einem kleinen planaren Chip angeordnet. Die Synthese (Labeln) erfolgt mit den entsprechenden Basen oder mehrbasigen Oligonukleotiden (Basen- Sequenzen) über eine lichtaktivierte ortsspezifische Bindung. Die Benetzung dieser spezifisch "gelabelten" Kapillaren mit den zu untersuchenden DNA-Analyten und der anschließenden Detektion der Bindungsreaktion über geeignete "Licht-marker" schließt das Verfahren ab.

30

4.1 Kapillar Chips - FCC als Trägermatrix

Die Chip- Produktion besteht aus der Erzeugung des Trägerkörpers aus einem geeigneten, lichtdurchlässigen Material sowie dem biochemischen "Labeln" (Synthese) der Wände der einzelnen Kapillaren. Die spezifische Synthese kann entweder direkt bei der Chip- Produktion oder erst beim Anwender erfolgen.

Für die Trägerkörper können unterschiedliche Materialien (z.B. Glas oder Kunststoff) verwendet werden. Wichtig ist, daß die Wände der Kapillaren sowohl für die Anregungswellen bei der lichtaktivierten Synthese sowie die Lichtwellen (ggf. Anregung und Reaktionssignal) bei der anschließenden Detektion (Analyse) gut durchlässig sind. Je nachdem welches Material eingesetzt wird, müssen die Wände der Kapillaren beschichtet werden, damit die erste Ebene an Basen - lichtaktiviert - an der Oberfläche binden kann.

Die Geometrie der Chips entspricht beispielsweise einer "Scheckkarte", wobei die Größe der von den Kapillaren bedeckten Fläche von dem zur Detektion verwendeten CCD-Chip bestimmt wird (derzeit typische Abmessungen 25 x 37 mm). Für die Kapillaren im planaren Chip sind unterschiedliche Herstellverfahren einsetzbar. Hierbei ist der Einfluß der Querschnittsgeometrie der Kapillaren zu berücksichtigen, welcher großen Einfluß auf die entstehenden strömungstechnischen Kapillarkräfte und die Möglichkeit der Reinigung der Kapillaren hat. Als Herstellverfahren kann man zum Beispiel Laser, Fräsen, Ätztechniken oder Spritzguß verwenden.

Bei der Anordnung der Kapillaren in der Ebene sind die folgenden Aspekte zu berücksichtigen: Verwendet man eine Vielzahl an parallelen Kapillaren, so kann man die Zeiten bei der Synthese minimieren, allerdings ist die Benetzung bzw. Befüllung der einzelnen Kapillare entsprechend komplex. Hat man im anderen Extrem nur eine einzige lange Kapillare, so ist die

Synthese entsprechend langsam, da das Multiplexing von Kapillaren zu Basen oder ganzen Oligos nicht verwendet werden kann und alle Vorgänge nur seriell nacheinander ablaufen können. Der Vorteil nur einer Kapillare liegt in der Analyse, wo die Probe an jedem Meßpunkt in allen Kapillaren vorbeiströmt.

4.2 Nukleinsäureanalytik mittels Oligo-chips - Grundprinzip

Wie bereits für mehrere Anordnungen gezeigt (z.B. Molekular Medizin Today, 9/97, S. 384-389; Trends in Biotechnology, 11/97, S. 465-468) kann die Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen an eine meist kurze komplementäre Sequenz, ein sog. Oligonukleotid oder Oligo, für die Sequenz-Analyse verwendet werden. Dazu werden hochdichte Anordnungen synthetischer Oligos auf einer festen Matrix erzeugt und erlauben multiple parallele Hybridisierungsexperimente. Führendes Verfahren (August 98) ist eine photolithographische und damit lokale Aktivierung von Synthese-Vorstufen. In Anlehnung an die aus der Mikroelektronik entlehnte Technik werden die parallelen Anordnungen als Chips bezeichnet.

Durch eine massive Erhöhung der Zahl an 'Meßpunkten', d.h. definierten Oligos an definiertem Ort, wird eine enorme analytische Kapazität geschaffen.

Die zu untersuchende Probe enthält normalerweise DNA oder RNA. Diese muß eventuell isoliert und in einem Amplifizierungsschritt (z.B. PCR) vermehrt werden und erhält dabei eine Markierung, z.B. ein Fluoreszenzlabel.

Durch ausreichend viele Meßpunkte ist auch eine Sequenzierung eines DNA Moleküls möglich (Sequencing-by-Hybridization SBH, siehe BioTec 3/98, S. 52-58), andere Anwendungen zeigen die Bestimmung von

Punkmutations-Polymorphismen (d.h. Unterschiede zwischen Individuen in einzelnen Basen in einem definierten DNA Abschnitt) und erlauben u.a. eine Identifizierung von solchen Polymorphismen bei hunderten von Probanden parallel (Science 280, 5/98, S. 1077-1082).

5

Erstmals wird auch die Untersuchung von ganzen Genomen und des Gen-Expressions- Status ganzer Zellen möglich (z.B. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 95, 3/98, S. 3752-3757).

10

Die hier beschriebene Erfindung läßt demnach die Anwendung einer Vielzahl von etablierten Verfahren zur Untersuchung von Nukleinsäuren und genetischem Material zu. Damit ist gleichzeitig ein starker Anstieg solcher Anwendungen und damit ein enormer wissenschaftlicher Fortschritt verbunden, da erwartet wird, daß der 'Fraktal Capillary Chip - FCC' eine solche Technologie flexibler als die vorhandenen Verfahren und zu deutlich niedrigeren Kosten bereitstellt.

15

4.3 Lichtaktivierte Synthese von Oligos (und kurzen Peptiden) an die Kapillarwände

20

Beim Labeln des FC-Chips werden in den einzelnen Kapillaren im Chip, mittels Photoaktivierung durch eine geeignete Lichtquelle (GenChip von Affymetrix: 365 nm mit 14 mW pro cm² bei 2 cm Lauflänge in einer Quarzküvette) einzelne Basen (G, A, C, T) oder Oligo-Molekül-Sequenzen (etwa 2 bis 4 Basen lang) ortsspezifisch angelagert. Alle Kapillaren werden wie bei der GenChip- Produktion von Affymetrix sequentiell mit G, A, C und T gefüllt und entlang der Kapillaren ortsspezifisch mit hochauflösendem Licht bestimmter Wellenlänge und Intensität bestrahlt. Zwischen den Beschichtungszyklen werden die Kapillaren entsprechend gespült, um nicht gebundene Basen oder Oligos zu beseitigen.

25

30

Hierdurch entstehen in jeder Kapillare eine Vielzahl an Meßpunkten (spezifische Bindungs- bzw. Hybridisierungsstellen), wobei jeder Meßpunkt aufgrund seiner individuellen Basensequenz für die Hybridisierung und anschließende Detektion eines spezifischen DNA-Fragmentes dient. Die Meßpunkte sind in der einen Dimension des planaren Chips durch die Wände der Kapillaren von einander getrennt und in der zweiten Dimension, entlang der einzelnen Kapillaren, wird zwischen zwei benachbarten Meßpunkten bei der Photoaktivierung ein entsprechender Freiraum gelassen.

Die Photolithographie kann auch weiterhin für die lichtaktivierte Bindung der Basen verwendet werden. Es können aber auch andere Verfahren eingesetzt werden.

Besonders bevorzugt wird ein Belichtungsverfahren unter Verwendung einer LCD-Lichtquellenmatrix (Flüssigkristallanzeige-Matrix), deren Matrixpunkte bzw. Lichtquellenelemente gezielt steuerbar sind, insbesondere hinsichtlich der Farbe und der Intensität des Lichtes. Mit einer solchen LCD-Matrix können also jeweils benötigte zweidimensionale Belichtungsmuster auf einfache Weise insbesondere rechnergestützt erzeugt werden. Die bevorzugte Photoaktivierung der Oligos bei der Herstellung des FCC-Chips erfolgt direkt durch den LCD-Chip. Die hierfür benötigte Wellenlänge von 365 nm (oberer UV-Bereich nahe dem sichtbaren Licht) läßt sich, sofern noch nicht verfügbar, leicht z.B. durch einen Wechsel der Hintergrundlichtquelle im LCD-Chip erreichen.

4.4 CCD-Chip-Detektion der spezifischen Nachweisreaktion

Wie beschrieben soll die Bindung eines DNA-Analyten direkt oder indirekt zu einem Lichtsignal führen. Dies kann beispielsweise durch ein Anregungslicht (Fluoreszenz) oder durch Photonenemission (Lumineszenz) erfolgen. Zur Signaldetektion wird ein CCD-Chip

verwendet, der direkt unter dem FC-Chip plaziert wird. Die Anregungslichtquelle wird über dem FC-Chip plaziert und es wird entsprechend im Durchlichtverfahren gemessen.

- 5 Jedes Lichtsignal wird auf dem CCD-Chip erfaßt, und zwar sowohl nach Wellenlänge (Farbe) als auch nach Intensität differenziert. Das aufgenommene Spektrum kann qualitativ oder quantitativ ausgewertet werden. Zudem läßt die Unterscheidung von Wellenlängen und Intensitäten auch eine Unterscheidung von Signalquellen zu.

10

Die Anregungslichtarten für das Nachweisverfahren müssen je nach Anforderungen monochromatisch (z.B. Laserlicht für Fluoreszenzanregung) oder heterogen (z.B. Weißlicht für Absorptionsmessung) gewählt werden.

15

5 Entwickelte Verbesserungen und damit geschaffene Vorteile gegenüber vorhandenen Systemen

20

Im wesentlichen werden durch die neuen FC-Chips (Trägersystem für die DNA-Analyt-Detektion) die nachfolgend aufgeführten Nachteile der GenChip-Technologie von der Firma Affymetrix überwunden:

25

* Das Prinzip der flächigen Benetzung der gesamten Chipoberfläche mit Fluid erlaubt keinerlei Multiplexing in der Produktion. So erhöht sich die Zahl der Herstellungszyklen für 20 Basen lange Oligos bei einer Verwendung von Dinukleotiden ($4^2 = 16$ Möglichkeiten) von $4 \times 20 = 80$ Hybridisierungsschritten auf $16 \times 10 = 160$, was eine Verdoppelung bedeutet. Das Gleiche gilt natürlich auch für die zwischengelagerten Waschzyklen.

30

* Die Synthese der photoaktivierbaren Basen an die planare Chipoberfläche, ebenso wie die benötigten Waschschrte bei der Chipherstellung sind, außer durch platz- und handhabungsintensive

Tauchvorgänge (Chip wird in Flüssigkeit getaucht) oder flüssigkeitsintensive Spülvorgänge entlang der Oberfläche, nicht realisierbar, was von der Geräteentwicklung her gesehen ein sehr großes Miniaturisierungs- und Automatisierungshemmnis darstellt.

- 5 * Bei der anschließenden DNA-Sequenz-Detektion ist eine gleichmäßige Verteilung der Probe auf der Chipoberfläche aufwendig (keine einfachen und damit zuverlässigen Mischverfahren möglich) und es Bedarf einer entsprechend großen Menge an Proben-Fluid. Die Suche nach einem seltenen Ereignis in der Probe ist nicht möglich, da ein ausreichender Kontakt aller Probenbestandteile mit allen spezifischen Meßpunkten nicht gewährleistet werden kann.

5.1 Reduktion der Produktionszeiten durch Multiplexing beim Synthetisieren

15 Der wesentliche Fortschritt der neuen DNA-BioChips liegt in der Möglichkeit der drastischen Reduktion der Herstellzeiten bei der individuellen Synthese der Chips (Labeln) durch ein entsprechendes Multiplexen zwischen Basen bzw. Oligos als Einsatzstoff und den Kapillaren.

20 Für die ortsspezifische Erzeugung einer Vielzahl an unterschiedlichen Basen-Sequenzen einer bestimmten Länge (z.B. 20 Basen) auf einer planaren Oberfläche mittels örtlich hochauflösender Photoaktivierung benötigt man in jeder Ebene (Rechenbeispiel: 20 Basen in jeder Basen-Sequenz) des DNA-Chip-Arrays 4 (bedingt durch die vier verschiedenen Basen) Syntheszyklen. Für 20 Basen- Ebenen sind es folglich $4 \times 20 = 80$ Zyklen. Hinzu kommt mindestens noch je ein Waschzyklus, was in Summe min. 80 Waschzyklen und damit 160 Gesamtzyklen bedeutet.

30 Verwendet man auf der gleichen Oberfläche Dinukleotide (2 Basen) so entstehen 2 Ebenen auf einmal, allerdings sind für diese zwei Ebenen $4^2 = 16$ Syntheszyklen sowie die entsprechenden Waschschr

notwendig. Für 20 Ebenen werden folglich $10 \times 16 = 160$ Synthesezyklen und damit 320 Gesamtzyklen anstelle von 160 Zyklen benötigt, was eine Verdoppelung der Produktionszeiten bedeutet. Bei der Verwendung von Trinukleotiden (3 Basen) verstärkt sich dieser Effekt auf mehr als die fünffache Anzahl an Zyklen. Somit ist bei einer einfachen planaren Oberfläche die Verwendung von einzelnen Basen als die schnellste Möglichkeit zur photoaktivierten DNA-Chip Erzeugung gegeben. Es besteht keine Möglichkeit die Anzahl an Synthesezyklen zu reduzieren.

Bei der Synthese des FC-Chip besteht im Unterschied hierzu die Möglichkeit, die Einsatzstoffe, sprich die Basen oder die unterschiedlichen Varianten der Di- ($4^2 = 16$ Kombinationen) oder Trinukleotide ($4^3 = 64$ Kombinationen) auf verschiedene Kapillaren zu verteilen. D.h., zumindest in den unteren - "chipnahen" - Ebenen wird je Kapillare nur immer eine Base bzw. eine der möglichen Basen- Sequenzen eingebracht. Je nach Festlegung der insgesamt zu erzeugenden Basen-Sequenzen in den Kapillaren des FC-Chip kann es sein, das in den oberen Ebenen dieses Prinzip teilweise aufgehoben werden muß, sprich für eine Basen-, Di- oder Trinukleotid- Ebene muß mehr als eine Base oder Oligo durch eine der Kapillaren fließen. Dadurch erhöht sich auch hier die Anzahl der Synthesezyklen ggf. wieder etwas. Insgesamt bleibt jedoch eine sehr große Reduktion der Herstellzeiten auf theoretisch $1/4$ der Zyklen bei einfachen Basen, $1/8$ der Zyklen bei Dinukleotiden und auf $1/16$ der Zyklen bei Verwendung von Trinukleotiden als Einsatzstoffe bei der Chip- Synthese (und so weiter bei längeren Oligos). Die Anzahl der für einen spezifischen Chip benötigten Zyklen ist für jeden Chip individuell und kann nur als statistischer Mittelwert angegeben werden, wenn die Anzahl an Meßpunkten auf bzw. in dem Chip, die Anzahl an parallelen Kapillaren und die Länge der auf dem Chip zu synthetisierenden Oligos vorgegeben ist. Die Optimierung der Synthesezeiten eines FC-Chips soll mittels eines zu entwickelnden Softwaretools (z.B. CAMS

Computer Aided Multiplexing Synthesis) erfolgen, welches in die Steuerung des zu entwickelnden Analysesystems bzw. in den angekoppelten Rechner integriert wird.

5 5.2 Reduktion der Einsatzstoffe und Qualitätssicherung

Die Verwendung von Kapillaren reduziert die benötigte Fluidmenge und erhöht gleichzeitig die Qualität sowohl bei der Chip- Synthese, als auch bei der anschließenden Detektion einer Probe, im Vergleich zur
10 Verwendung einer einfachen Fläche sehr stark. So ist das gleichmäßige Benetzen von Kapillaren strömungstechnisch sehr einfach, verbraucht wenig Fluid und ist daher sehr leicht miniaturisier- und automatisierbar. Dies gilt insbesondere auch für die benötigten Waschvorgänge der Kapillaren mit einer ausreichenden Qualität.

15

Durch die Wände der Kapillaren, welche im Prinzip den Zwischenraum zwischen zwei Meßpunkten im FC-Chip-Array bedecken, wird das benötigte Fluid bereits um 50% reduziert. Dies gilt sowohl für das Beschichten (coating) des Chips in der Produktion, das Synthetisieren
20 (Labeln) der Oligos als auch für den "Probenauftrag" für die DNA-Fragment- Analyse. Eine weitere Reduktion der Fluidmengen erfolgt durch die gute Benetzung der Kapillarwände durch ein durchströmendes Fluid und vor allem durch die effektiven Waschvorgänge, welche zum Beispiel durch "reinigende" Luftblasen in den Kapillaren stark verbessert
25 werden können. Eine gute, statistisch ausreichende, Verteilung der Probe auf einer Fläche ist dagegen nur mit einer sehr großen Probenmenge realisierbar.

Ein weiterer Vorteil der Kapillartechnik liegt in den kürzeren Zykluszeiten,
30 welche durch die kleineren Fluidvolumina und die damit verbundenen schnelleren chemischen Reaktionen und Abläufen entstehen. Dies hat sowohl kürzere Synthese- als auch Hybridisierungszeiten zur Folge.

Zusätzlich wird hierdurch eine deutliche Fehlerreduktion sowohl bei der Produktion wie bei der Detektion erzielt, was die Zahl der auswertbaren Messungen pro Material- und Zeiteinsatz weiter erhöht und die Grundlage für eine Qualitätssicherung bildet, welche auf genau definierbare und reproduzierbare Strömungsvorgänge aufbaut.

Die einfache Miniaturisierung und Automatisierung der Abläufe in den neuen FC-Chips bilden die Basis für eine einfache Miniaturisierung und Automatisierung des gesamten neuen Analysesystems, welches auf den FC-Chips aufbaut.

5.3 Dreidimensionale Reaktionsoberflächen

Durch eine geeignete Auslegung der Querschnittsgeometrie der einzelnen Kapillaren läßt sich die nutzbare Reaktionsoberfläche vergrößern. Die Größe dieser Fläche ist für die Anlagerung der Oligos bei der Produktion ebenso von Bedeutung wie für die Anlagerung der vorbeiströmenden DNA-Fragmente aus der Probe und der daraus resultierenden Intensität der Lichtsignale bei erfolgter Hybridisierung.

So hat eine rechteckige Kapillare, gleiche Höhe wie Breite vorausgesetzt, bei einer Nutzung der Wände und der Decke die vierfache Reaktionsoberfläche bei einer identischen Grundfläche, sprich dem gleichen Platzbedarf in den zwei Dimensionen eines planaren Chips. Selbst wenn man die Kapillaren, aus strömungstechnischen Anforderungen heraus, innen rund auslegt (zum Beispiel bessere Reinigungsmöglichkeiten durch Luftblasen in der Kapillare), bleibt noch eine etwa dreifache Reaktionsoberfläche im Vergleich mit einer planaren Oberfläche. Durch die Nutzung dieser dreidimensionalen Strömungsgeometrie kann der Einsatzstoffbedarf (Produktion und Analyse) weiter reduziert werden.

Ein anderer Effekt läßt sich ebenfalls durch die Querschnittsgeometrie der Kapillaren beeinflussen: Die Lichtbrechung am Übergang vom Innenraum der Kapillaren in das umgebende Material des Chips. So hat jede Krümmung entweder einen fokusierenden oder streuenden Einfluß auf die Ausbreitungsrichtung des Lichtes. So kann man beim FC-Chip durch eine entsprechende Wahl der Ober- und Unterseite der Strömungskanalgeometrie die Lichtwege optimieren.

5.4 Parallele CCD-Chip Detektion

Das Messen der Lichtsignale aller Meßstellen des FC-Chips "auf einmal" nutzt das ständig wachsende Potential der hochauflösenden CCD-Kamera Chips. Diese erlauben die Detektion aller Lichtsignale zum Reaktions- bzw. Hybridisierungsnachweis in einem einzigen Meßvorgang. Hierfür stellen aktuelle Farb-CCD-Chips auf einer Fläche von 25 x 37 mm etwa 2000 x 3000 Farbpixel mit einer Pixelgröße von etwa 10 x 10 μm zur Verfügung. Der Stand der Forschung ist bereits bei entsprechenden CCD-Chips mit ca. 4000 x 6000 Farbpixeln. Die Signaldetektion erfolgt in Bruchteilen einer Sekunde für alle Pixel synchron. Damit ergibt sich auch für die beschriebene Applikation der CCD-Chip Technologie ein großes Wachstumspotential und die parallele Detektion von 10^6 individuellen Meßpunkte im FC-Chip ist technisch machbar. Dadurch werden die zeitaufwendigen Scann-Vorgänge herkömmlicher Systeme vermieden und die reine Meßzeit reduziert sich auf ein Minimum, welche im Verhältnis zu anderen Verfahrensschritten völlig bedeutungslos wird.

Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

5.5 Direktdetektion ohne Optik

Die direkte Detektion der Lichtsignale, ohne Optik, durch einen CCD-Chip hat den Vorteil einer wesentlich niedrigeren Energiemenge, welche das Licht für eine fehlerfreie Detektion benötigt. Eine solche Anordnung soll - in einem anderen Zusammenhang untersucht - lediglich 10% der Anregungslichtmenge einer vergleichbaren Anordnung mit einer Optik verbrauchen. Anders ausgedrückt, die Optik schluckt 90% der Lichtenergie. Durch die geringere Lichtintensität werden unerwünschte Streulichteffekte im - die Kapillaren umgebenden - Chip, ebenso wie eine eventuelle notwendige Kühlung der verwendeten Lichtquelle, stark reduziert. Außerdem bedeutet der Wegfall einer Optik eine große Platzersparnis sowie eine Verringerung der Herstellkosten für die Detektionseinheit.

Aufwendige Bewegungseinrichtungen für den Träger (Chip) oder die Detektionseinheit, wie sie in Scannern notwendig sind, entfallen ebenfalls völlig. Die vorgegebenen Abmessungen der CCD-Chips (mehrere cm²) ermöglichen die Verwendung einer sehr großen Zahl an parallelen Kapillaren (mehrere 100) mit einer moderaten Kanalgröße (im 10 µm Bereich).

5.6 Disposable Chips

Die FC-Chips als neue DNA-Analyse-Chips können als einfache Disposables (Einweg-Chips) ausgeführt werden. Prinzipiell sind sowohl Glas- als auch Kunststoff-Chips (kostengünstige Spritzguß-Chips) sowie andere Ausführungen möglich.

Die bekannten "GenChips" von Affymetrix sind ebenfalls als Disposable für ein bis maximal fünf Messungen ausgelegt. Hier spricht jedoch der,

aufgrund der aufwendigen Herstellung der Chips, sehr hohe Preis gegen das Wegwerfen des Chips nach nur einer Messung.

5.7 Flexibilität der Anwendung

5

* Die schnelle und kostengünstige Produktion wird eine Vielfalt von individuellen Anwendungen ermöglichen, bei denen z.B. unter Berücksichtigung von Sequenz- und Gendatenbanken im Internet gezielt Oligonukleotid-Arrays synthetisiert werden.

10

* Durch die Verwendung einer einzigen, vielfach gewundenen oder spiralförmigen Kapillare könnte eine Hybridisierung im (langsamen) Durchfluß etabliert werden, die auch die Detektion von seltenen Ereignissen (z.B. selten exprimierte Gene) ermöglicht. Damit würde ein chromatographisches Prinzip in die DNA Array Technologie eingeführt werden.

15

* Durch die Verwendung von Di-, Tri- oder längeren Oligonukleotiden als Synthesebausteine erscheint eine weitere Reduktion der Herstellungszeiten realistisch. Vor allem für einfachere Arrays könnten Syntheseeinheiten direkt beim Kunden zur Anwendung kommen und damit die Zusammensetzung des Arrays endgültig individualisieren.

20

* Die große Flexibilität der Technologie ist auch im Hinblick auf die Erkenntnis von Bedeutung, daß sich die Gene einzelner Individuen sehr stark unterscheiden, so daß man keinen generellen Genkatalog für alle Spezies anlegen kann. Der FC-Chip eröffnet hier die Möglichkeit, zum Beispiel in einem ersten Meßzyklus die Basisdaten, wie sie im Internet - frei zugänglich oder nur spezifisch für den Systemkunden - bereitgestellt sind mit den individuellen Unterschieden eines Patienten abzugleichen und aus den Ergebnissen einen entsprechenden zweiten DNA-Array zu bilden, welcher die eigentlichen Tests auf das Individuum angepaßt durchführt.

25

30

- * Die erfindungsgemäße Lösung kann auch für die Synthese von Peptidsequenzen in den Kapillaren verwendet werden. Damit würden für eine Vielzahl von Anwendungen hoch komplexe und zugleich kostengünstige Peptidarrays bereitgestellt werden.

5

6 Überblick über einige Aspekte der Erfindung

6.1 FC-Chip Ausführungsvarianten

10

Bei der Gestaltung ebenso wie bei der Fertigung der FC-Chips gibt es eine Vielzahl von Ausführungsvarianten. Bei der Anordnung der Kapillaren im FC-Chip über der Fläche der Detektionseinheit ist die Verwendung nur einer Kapillare ebenso denkbar wie die Anordnung einer Vielzahl an parallelen Kapillaren. So wären auf einer Fläche von 25 x 37 mm

15

fertigungstechnisch problemlos 500 Kapillaren (Stand der Technik: 500 parallele Kapillaren mit einem Durchmesser von 900 nm) mit einer Länge von 37 mm und jeweils etwa 750 Meßpunkten anzuordnen. Die gleiche Anzahl an Meßpunkten ($500 \times 750 = 375.000$) ließe sich auch in einer einzigen schlangenförmigen Kapillare mit etwa 20 m Länge unterbringen.

20

Der Vorteil nur einer Kapillare liegt in der Präsentation der Probe an allen Meßpunkten des Arrays und ist daher für die Suche nach seltenen Bestandteilen besonders geeignet. Ein Vielzahl an parallelen Kapillaren hat den Vorteil, daß sich die Produktionszeiten bei der Chip- Synthese durch das Multiplexen von Einsatzstoffen und Kapillaren sowie alle Strömungsvorgänge minimieren lassen. Deshalb ist diese Kapillaranordnung für die Chip-Synthese sowie alle Analysen mit einer ausreichenden Anzahl an Kopien jedes Analyten in der Probe zu bevorzugen.

25

30

Um beide Vorteile in einem Chip zu nutzen ist es möglich die Einsatzstoffe bei der Chip- Synthese mittels paralleler Nadeln am Zugang

zu den Kapillaren einzubringen, obwohl die Kapillare von der Probeneingabe an nur aus einem einzigen, langen Mikrokanal besteht. Dieser Effekt kann auch durch die Integration von Ventilen in den Chip erfolgen. So hat die Firma Biacore fluidisch angesteuerte Ventile in einem zweiteiligen Spritzguss-Chip durch eine Membran realisiert, welche von unten in die Kanäle auf der Oberseite des Chips drückt und so die Kanäle verschließt.

Als Anordnung für die Kapillaren über der Detektorfläche ist eine Vielzahl an Strukturen und Mikrokanalverläufen möglich. Für eine hohe Parallelität der fluidischen Vorgänge sind beispielsweise parallele oder snakeförmige Strukturen naheliegend. Die Aufteilung der Kapillaren sollte hierbei nach dem Dualprinzip erfolgen, wo aus jeder Kapillare zwei neue entstehen und alle Kapillaren gleich lang sind. So erreicht man nach 10 Teilungen bereits $2^{10} = 2048$ Kapillaren. Spiralförmige Anordnungen haben den Vorteil, das sie weniger turbulente Strömungsvorgänge aufweisen und besser zu reinigen sind. Ihr großer Nachteil liegt in der Zu- bzw. Abführung, welche in der dritten Dimension nach oben oder unten erfolgen muß, was fertigungstechnisch und optisch sehr ungünstig ist.

Als Material für die Chips ist beispielsweise Glas oder Kunststoff möglich. Der Aufbau kann in zwei Schichten erfolgen, welche zum Beispiel durch Kleben aneinander gefügt werden. Die Struktur der Kanäle kann hierbei entweder nur in die eine, oder aber in beide Seiten bzw. Hälften eingebracht werden. Hierfür sind als Fertigungsverfahren u.a. Laser oder Präzisionsfräsen verwendbar. Besonders kostengünstig ist Spritzguß, welcher in einer ausreichenden Qualität gefertigt werden kann zum Beispiel über photolithographisch geätzte Silizium- Spritzgußwerkzeuge bzw. Formen.

6.2 FC-Chip - Synthese

Für die Synthese der individuellen Fänger- Oligos auf die Meßpunkte im DNA-Chip-Array gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Der Kunde erstelt fertige Chips vom Hersteller mit einer vorgegebenen Auswahl an immobilisierten Basen- Sequenzen, oder er synthetisiert sich in einer Syntheseeinheit seine selbstgewählten Sequenzen auf ungelabelte Chips. Informationen über entsprechende Sequenzen können zum Beispiel aus Datenbanken im Internet entnommen werden, die hier frei oder auch spezielle durch den Chip- Hersteller bereitgestellt werden.

6.2.1 Syntheseeinheit

Die Syntheseeinheit besteht aus einer geeigneten Lichtquelle, welche die Meßpunkte im DNA-Chip-Array bei der Synthese der Basen oder Basen-Sequenzen an die Chipoberfläche bzw. die Kapillarwände ortsspezifisch hochgenau und exakt auflösend bestrahlt. Für die notwendige Lichtquelle am Übergang vom Ultravioletten zum Sichtbaren Licht wird von der Firma Affymetrix für die Produktion Ihrer GenChips Licht mit ca. 360 nm bei 14 mW pro cm² und einer Lichtlauflänge von 2 cm in einer Standard- Quatzküvette angegeben. Verwendet wird hierzu eine Photolithographie- Einrichtung, wie Sie in der Halbleiter- Chip- Produktion für das lichtaktivierte Ätzen von Si- Wavern zum Einsatz kommen [Schnittstelle zum LCCD Patent, sofern es nicht integriert wird].

Wie bereits unter 4.3 erwähnt, kann die Belichtung auch mittels eines LCD-Chips (LCD-Lichtquellenmatrix) erfolgen.

6.2.2 Fertige Chips - Synthese beim Hersteller

Beim Vertrieb fertiger Chips erfolgt die Synthese beim Hersteller. Dieser benötigt hierfür eine entsprechend leistungsfähige Syntheseeinheit,

welche möglichst lange Oligos (3 oder mehr Basen lang) als Einsatzstoffe verwendet, die über parallele Nadeln in die Kapillaren eingebracht (eingespritzt) werden, und so die Syntheszeiten pro Chip minimieren (Multiplexing). Hierbei ist es möglich, in den Chips spezielle Zugänge für die Nadeln vorzusehen, mit dem Ziel möglichst viele parallele und damit kurze Kapillaren zu erhalten, unabhängig davon, welche Kapillarstruktur für den Analysevorgang vorgesehen ist.

6.2.3 Einsatzstoffe im Chip

Für Anwendungen, wo es nicht auf eine schnelle Synthese der Chips, aber auf eine Individuelle Gestaltung der Arrays ankommt, wäre eine Bereitstellung der Einsatzstoffe (G, A, C, T und Buffer etc.) direkt im Chip in entsprechenden Reservoirs möglich. Die überflüssigen Einsatzstoffe müssen in einer entsprechenden Kammer im Chip aufgefangen werden. Das Volumen einer solchen Kammer ist durch eine Ausdehnung in der dritten-Dimension nach oben oder unten problemlos auf ein Vielfaches des gesamten Kapillarovolumens auslegbar. Eine Anwendungen dieser Chip- Variante wäre gerade für Forschungslabors, aber auch kleine Arztpraxen denkbar.

Das Prinzip der Kapillarkraft kann hierbei in einer möglichen Ausführungsvariante direkt für den Fluidtransport im Chip verwendet werden. Jegliche Mechanik würde entfallen und die Befüllung der Kapillaren mit den Einsatzstoffen sowie der Probe könnte über die einfache Verstellung eines Ventils im Chip erfolgen. Die "Abfallkammer" könnte durch die Einbettung eines geeigneten Vließ-Stoffes eine unterstützende Saugwirkung entwickeln. Um eine Minimierung der benötigten Fluidmengen zu erreichen, sollte bei diesen Einwegströmungs-Ausführungen (kein Zirkulation und damit Wiederverwendung der Einsatzstoffe) auf immer gleich lange Kapillaren geachtet werden. Dies ist

ebenfalls von Bedeutung für das Funktionieren der Kapillarkraft als Pumpe.

Ein weitere Variante ist eine vertikale Ausrichtung der planaren Chips, so daß auch Gravitationskräfte für den Fluidtransport im Chip genutzt werden können. Wenn diese Kräfte nicht ausreichen, um alle notwendige Fluidtransporte in den Chips zu realisieren, so sind andere geeignete Pumpmechanismen vorzusehen. Eine Möglichkeit hierzu ist eine elektrophoretische Bewegung der Fluide durch - in den Chip integrierte - Elektroden, oder durch eine Volumenreduktion in Kammern des Chips durch einen entsprechenden Krafteintrag von außen in den Chip (klassische Pumpe).

6.2.4 Einsatzstoffe in der Syntheseeinheit

Die Bereitstellung der Einsatzstoffe für die Chip- Synthese in Vorratsbehältern bietet prinzipiell den Vorteil des Multiplexens von fertigen Basen- Sequenzen und parallelen Kapillaren, weshalb diese Ausführungsvariante für HTS, UHTS und Chip- Hersteller empfehlenswert ist. Das Multiplexen kann durch die Nadeln an der Schnittstelle zum Chip erfolgen, in dem die Nadeln - je Nadel wird eine spezifische Basen- Sequenz bereitgestellt - für jeden Synthese- Zyklus eine andere Kapillare benetzen. Eine technisch aufwendigere, aber ggf. zuverlässigere Methode ist ein Multiplexen im Gerät, wobei die Nadeln je Chip immer mit einer Kapillare verbunden bleiben. Hier ist die Verschleppung zu beachten, welche durch die Verwendung unterschiedlicher Basen- Sequenzen in den Nadeln entstehen kann.

Ein weiterer Punkt, welcher berücksichtigt werden muß, ist das Auffangen und Beseitigen des überschüssigen Materials am Ausgang der einzelnen Kapillaren. Hier ist sowohl eine Zirkulation (Wiederverwendung

des austretenden Materials) als auch eine Beseitigung der austretenden Einsatzstoffe denkbar.

6.3 Analytbestimmung

Die Analyse von Nukleinsäure- Sequenzen erfolgt wie bei anderen Oligonukleotid-Arrays durch Hybridisieren von Nukleinsäuren im Probenmaterial an komplementäre Stränge unter den immobilisierten Oligonukleotiden.

Als eine weitere mögliche Anwendung des FCC können auch Peptidsequenzen in den Kapillaren angekoppelt werden, ebenfalls nach photolithographischen Syntheseprinzipien. Solche Peptide sind zu vielfältigen und teilweise hochspezifischen Bindungsreaktionen mit Peptiden, Proteinen und anderen Substanzen in der Lage, so daß sich das Spektrum potentieller Analyten erheblich ausweiten läßt.

Die Synthese im FCC würde erstmals massiv parallele und gleichzeitig kostengünstige Peptid-Arrays für eine Vielzahl von Anwendungen zur Verfügung stellen.

6.3.1 Potentielle Analyten

- * Nukleinsäuren (DNA, RNA, in Spezialfällen auch PNA)
- * Proteine, Polypeptide und Peptide in allen Erscheinungsformen
z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Tumorantigene, Serumfaktoren, Antikörper
- * Carbohydrate in verschiedener Kombination
z.B. verschiedenen Zucker in Lebensmitteln oder Agrarpflanzen, funktionelle Zucker, Polymer
- * Andere organische Moleküle

z.B. drugs of abuse', Pharmaka, Metabolite, Aminosäuren,
Transmitter, Pestizide, Insektizide, Lacke, verschieden Toxine

6.3.2 Varianten zur Bindung (immobilisierter Interaktionspartner)

* Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren

z.B. längere Moleküle wie cDNA, synthetische Oligonukleotide,
PNA, RNA

* Peptide und deren Bindung an Analyten

z.B. synthetische Peptide, natürliche Peptide

6.3.3 Varianten zur Signalerzeugung

Zwei Prinzipien zur Signalerzeugung sollen vorrangig etabliert werden: die direkte Detektion eines vorher oder in der Reaktion markierten Analyten (bevorzugte Methode in der Nukleinsäureanalytik mittels Hybridisierung) und die indirekte Detektion durch Kompetition des Analyten bzw. der Zielsequenz mit einem markierten Standard. Die erste Variante ist für einige Anwendungen gut etabliert, für Diagnostik z.B. von Serumkomponenten aber eher schlecht geeignet, die mit Peptid-Arrays eventuell auch im FCC möglich sein wird. Die zweite Variante ist für diese Anwendungen daher vorzuziehen, außerdem erlaubt sie prinzipiell eine einfachere Probenvorbereitung durch den Anwender.

Varianten zur direkten Detektion:

* Markierung der Analyten mit Fluoreszenzfarbstoff.

* Markierung der Analyten mit Reporterenzym, anschließend Reaktion (z.B. Chemo- oder Biolumineszenz).

* Markierung nur des gebundenen Analyten, z.B. bei Nukleinsäuren durch interkalierende (Fluoreszenz-) Farbstoffe, Doppelstrang bindende Proteine oder Doppelstrang-bindende Antikörper.

* Sekundäre Detektion durch Detektion des gebundenen Analyten mit einer zweiten Komponente, z.B. bei PNA-DNA Hybriden durch DNA spezifischen Antikörper.

Varianten zu markierten Standards:

- 5 * Enzymgekoppelt (z.B. Chemo- und Biolumineszenz mit alkalischer Phosphatase, Peroxidase etc.).
- * (Fluoreszenz-) Farbstoff angekoppelt.
- * Herstellung von Proteinstandards als Fusionsprotein mit Reporterenzym (siehe oben) oder autofluoreszierendem Protein (z.B. GFP), z.B. für
- 10 rekombinante Antikörper, Protein-Hormone, Wachstumsfaktoren etc.

6.4 Bereitstellung des Probenmaterials

- 15 Für die Bereitstellung des Probenmaterials gibt es ebenfalls wieder unterschiedliche Ausführungsvarianten. Für die eigentliche Detektion ist ~~die Art der Bereitstellung nicht relevant, da an der Schnittstelle immer in~~ Flüssigkeit gelöste DNA-Fragmente in ausreichender Menge für die angestrebte Untersuchung bereitzustellen sind.

20

6.4.1 Externe Probenvorbereitung

- Die Probenvorbereitung kann entweder manuell im Labor, in einem getrennten Analysesystem oder in einer in das gleiche System
- 25 integrierten Vorbereitungseinheit erfolgen. Die detektionsbereite Probe wird dann mittels manuellem oder automatischem Pippettieren oder vergleichbaren Verfahren in den Chip eingebracht.

6.4.2 Probenvorbereitung im gleichen Chip "all in one"

30

Gerade, wenn das Multiplexen bei der Chip- Synthese zur Reduktion der Produktionszeiten verwendet wird, können gleiche oder sogar kürzere

Zeiten für das Labeln erreicht werden, als für die DNA- Amplifizierung der Probe mittels PCR notwendig ist. Dadurch wird eine Integration der PCR in das Synthese- System oder sogar in den Chip für viele Anwendungen sinnvoll.

5

Neben der zeitintensiven PCR ist auch der vorgelagerte Zellaufschluß zum Beispiel über gut automatisierbare Verfahren wie Ultraschall oder Hochspannung ebenso wie die DNA-Isolierung integrierbar.

10

6.5 Detektionseinheit

15

Die Auslesung der Lichtsignale für die Nachweisreaktionen im Kapillar-Chip-ARRAY (FCC) soll in einer Detektionseinheit erfolgen, wobei die Anregungslichtquelle (Fluoreszenz, Lumineszenz oder Absorption als optischer Nachweis) dem CCD-Chip zur Lichtsignalmessung direkt gegenüber angeordnet wird. Der Kapillar-Chip-ARRAY befindet sich genau in der Mitte zwischen Lichtquelle und Detektions-Chip (Sandwichbauweise). Als Anregungslichtquelle kann ein LCD-Chip (Flüssigkristallanzeige-Matrix) herangezogen werden. Die räumliche

20

Anordnung dieser Einheit kann je nach Bedarf erfolgen (z.B. Nutzung der Gravitation für Strömungsvorgänge im Chip). Durch diese möglichst kompakte Bauweise werden die Lichtlaufwege und damit auch die benötigte Lichtintensität minimiert. Auf die Verwendung einer aufwendigen, platzintensiven, lichtschluckenden und teuren Optik soll sowohl auf der Anregungs-, als auch auf der Detektionsseite verzichtet werden.

25

6.5.1 Temperatur bei der Hybridisierung

30

Die Temperierung (derzeit typischerweise bei 60°C - die Firma Genometrix beschreibt auch schon eine Hybridisierung bei 25°C mit niedrig Salz Bedingungen) bei der Hybridisierung kann entweder durch

entsprechende Temperaturelemente in der Detektionseinheit oder durch die Anregungslichtquelle bzw. das Anregungslicht an sich erfolgen. Temperaturelemente in den Chips wären auch möglich, würden aber dem Ansatz von Disposable-Chips entgegenstehen.

5

6.5.2 Anregungslichtquelle

Als Lichtquellen kommen je nach den Markern der Ziel-DNA-Analyten (Nachweisverfahren via Absorption oder Fluoreszenz etc.) folgende Lichtquellen in Frage:

10

- * Hochparalleles Licht aus einer Lampe (Weißes Licht).
- * Hochparalleles Licht aus einer Blitzröhre.
- * Hochparalleles monochromatisches Licht.
- * Monochromatischer Laserlichtstrich (lokale Anregung entspricht dem Scannerprinzip und nutzt damit die Parallelität der CCD-Chips nur noch bedingt).
- * Monochromatischer Laserstrahl (s.o.).
- * LCD-Matrix.

15

20

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einem entsprechenden optischen Gitter zwischen Anregungslichtquelle und FC-Chip Array.

25

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einer entsprechenden Optik zwischen Anregungslichtquelle und FC-Chip Array (nur wenn nicht vermeidbar).

6.5.3 CCD-Kamera Detektion

30

Die Detektionseinheit besteht nur aus einem CCD-Chip. Diese haben aktuell auf einer Fläche von ca. 25 x 37 mm etwa 2000 x 3000 Farbpixel, was 6 Mio. Farbpixeln oder 18 Mio. Einzelpixeln (RGB-Prinzip durch miniaturisierte Farbfilter vor den Pixeln) entspricht (Firma Cannon).

Ordnet man auf einer solchen Fläche von 25 x 37 mm etwa 500 parallele Kapillaren mit ca. 20 μm Durchmesser an (jede zweite Doppel-Pixelreihe), so erhält man in jeder Kapillare 750 Meßpunkte (Felder), wenn man nur jeden zweiten Doppel-Farbpixel unter der Kapillare nutzt. Damit hätte man 375.000 Meßpunkte auf einem einzigen Chip, wobei jeder Meßpunkt 4 Farb- bzw. 12 schwarz-weiß Pixel überdeckt und eine Fläche von 20 x 20 μm hat. Die Lichtsignale müssen möglichst dicht am optischen CCD-Chip erzeugt werden, damit eine fehlerhafte Zuordnung von Lichtsignalen und Meßpunkten mit ihrer spezifischen Basen- Sequenz sowie eine Überlagerung benachbarter Lichtsignale ausgeschlossen werden kann.

Die entstehende Vielzahl an Meßwerten ($4 \times 500 \times 750 = 1.5$ Mio. Farbsignale bzw. 4.5 Mio. Intensitätswerte zwischen 0 und 255 Digitalwerten), welche zur Verfügung stehen (aktueller Stand der CCD-Chip Technik), bilden die Basis welche eine umfangreiche Statistik bei der Analyse der detektierten Lichtsignale erlaubt. Das Bearbeiten der anfallenden Datenmengen ist, durch die Entwicklung der Leistungsfähigkeit bei gleichzeitigem Preisverfall von modernen Rechnersystemen, problemlos möglich.

Die Detektion der Nachweisreaktion kann sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen machen:

- * Welche Fängermoleküle (Position im Array) haben Anlagerungspartner gefunden (Auswertung der z.B. fluoreszenzmarkierten Labels).
- * Wieviele Fängermoleküle einer Klasse haben einen Hybridisierungspartner gefunden.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einem entsprechenden optischen Gitter zwischen dem FC-Chip ARRAY und dem CCD-Kamera Chip.

Wie oben ausgeführt, jedoch mit einer entsprechenden Optik zwischen dem FC-Chip ARRAY und dem CCD-Kamera Chip (nur wenn nicht vermeidbar).

- 5 Wenn die Detektion mit einer CCD-Kamera bzw. einem CCD-Chip keine ausreichenden Signale ergibt, kann die Detektion im Analysesystem auch mittels anderer, empfindlicherer Sensoren erfolgen.

- 10 Interessant im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer Inspektionseinheit, wie sie in der am Anmeldetag der vorliegenden Anmeldung von den Anmeldern eingereichten deutschen Patentanmeldung mit dem Titel "Lichtemissions-Detektionseinrichtung" beschrieben ist. Diese Inspektionseinheit umfaßt eine elektronisch steuerbare Lichtquellenmatrix (LCD-Matrix) und eine der
15 Lichtquellenmatrix zugewandt-gegenüberliegende Lichtsensormatrix, nämlich CCD-Bildaufnehmer.

- In diesem Zusammenhang ist es denkbar, daß der Anwender sich seine FCC-Chips selbst erzeugt und direkt verwendet. Er lädt sich einfach die
20 benötigten Daten (DNA-Sequenzen) von einer CD-ROM oder aus dem Internet und erzeugt in seiner LC-CCD-Einheit (Aufbau analog einem externen Disketten- oder CD-ROM-Laufwerk) seinen individuellen DNA-Chip, benetzt ihn anschließend mit der Probe und liest die Signale aus.

- 25 Mißt man z.B. jeden zweiten Pixel in dieser Anordnung für die Photoaktivierung, so kann man die Pixel dazwischen, welche in Projektion innerhalb einer Kapillare liegen, für eine permanente Prozeßkontrolle verwenden. So kann man z.B. das Einströmen einer Luftblase zwischen zwei Fluiden in einer Kapillare individuell und
30 dynamisch verfolgen. Auch ein Färben der Trägerfluide für G, A, C und T wäre denkbar, so daß die Anwesenheit der richtigen Oligos überprüfbar würde und eine Farbveränderung könnte eine Verschleppung

signalisieren. Bei der anschließenden Detektion könnte wiederum eine ortsspezifische und wenn notwendig sogar farbspezifische Lichtanregung erfolgen. Hierdurch ergeben sich ganz neue Möglichkeiten für Nachweisverfahren, wie sie derzeit noch nicht vorhanden sind.

5

Durch die Inspektionseinheit (LC-CCD-Einheit) können die Strömungsvorgänge in den Kapillaren in einem Glas- oder Kunststoffchip sowohl während der Produktion - sprich der Oligo-Synthese - als auch während der Analyse überwacht werden. Hierzu können z.B.

10

Reinigungsluftblasen zwischen zwei Fluiden in den Kapillaren oder eine Färbung der einzelnen Fluide verwendet werden.

15

Für die lichtinduzierte Abspaltung von Schutzgruppen während der Synthese von DNA-Oligos auf dem Chip kann eine LCD-Hintergrundlichtquelle dienen, die die notwendige Wellenlänge von 365 nm erzeugt. Die benötigten Leistungen sind gering.

20

Die Detektion der Nachweisreaktion im FCC-Chip kann ebenfalls in der Inspektionseinheit erfolgen. Wenn der Nachweis über Fluoreszenzmarker realisiert wird, müßte hierzu ggf. die Hintergrundbeleuchtung gewechselt werden (automatisch möglich). Gegebenenfalls kommen hier auch neue Detektionsverfahren zum Einsatz, welche erst durch die extrem flexible, individuelle Anstrahlung und Detektion des einzelnen Meßpunktes möglich werden.

25

Für eine Standard-Hybridisierung von DNA-, RNA- und PNA-Strängen miteinander benötigt man eine Temperatur von ca. 55 - 65°C. Im einfachsten Fall kann diese Temperatur durch die abgestrahlte Energie der LCD-Einheit erzeugt werden (Abwärme und Wellenlänge). Damit ließe sich eine weitere Kompaktierung der Anordnung erreichen.

30

Fig. 1 zeigt in einer stark schematisierten Draufsicht einen FCC-Chip (Träger) nach der Erfindung.

Fig. 2 zeigt Beispiele für Kapillaranordnungen in einem FCC-Chip nach der Erfindung.

Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung eines FCC-Chips in einer Inspektionseinheit aus LCD-Matrix und CCD-Matrix.

Fig. 1 zeigt den transparenten Träger (FCC-Chip) in einer Draufsicht in stark schematisierter Weise.

Man erkennt die parallel zueinander verlaufenden Kapillaren 1, beispielsweise 500 Kapillaren mit einer Länge von 37 nm. Mit T, G, A, C sind in Fig. 1 Reservoirs für die einzelnen Einsatzstoffe (Basen) bezeichnet. Mit 3 ist der Lufteinlaß bezeichnet. 5 kennzeichnet ein Ventil. 7 kennzeichnet die Probeneingabe und mit 9 ist ein Zugang für Reinigungs-/Waschflüssigkeit bezeichnet.

In Fig. 2 sind schematisch weitere Beispiele für Kapillaranordnungen dargestellt.

Fig. 3 zeigt den FCC-Chip nach Fig. 1 in einer Inspektionseinheit aus LCD-Matrix und CCD-Matrix, wie sie weiter oben bereits angesprochen wurde.

Ansprüche

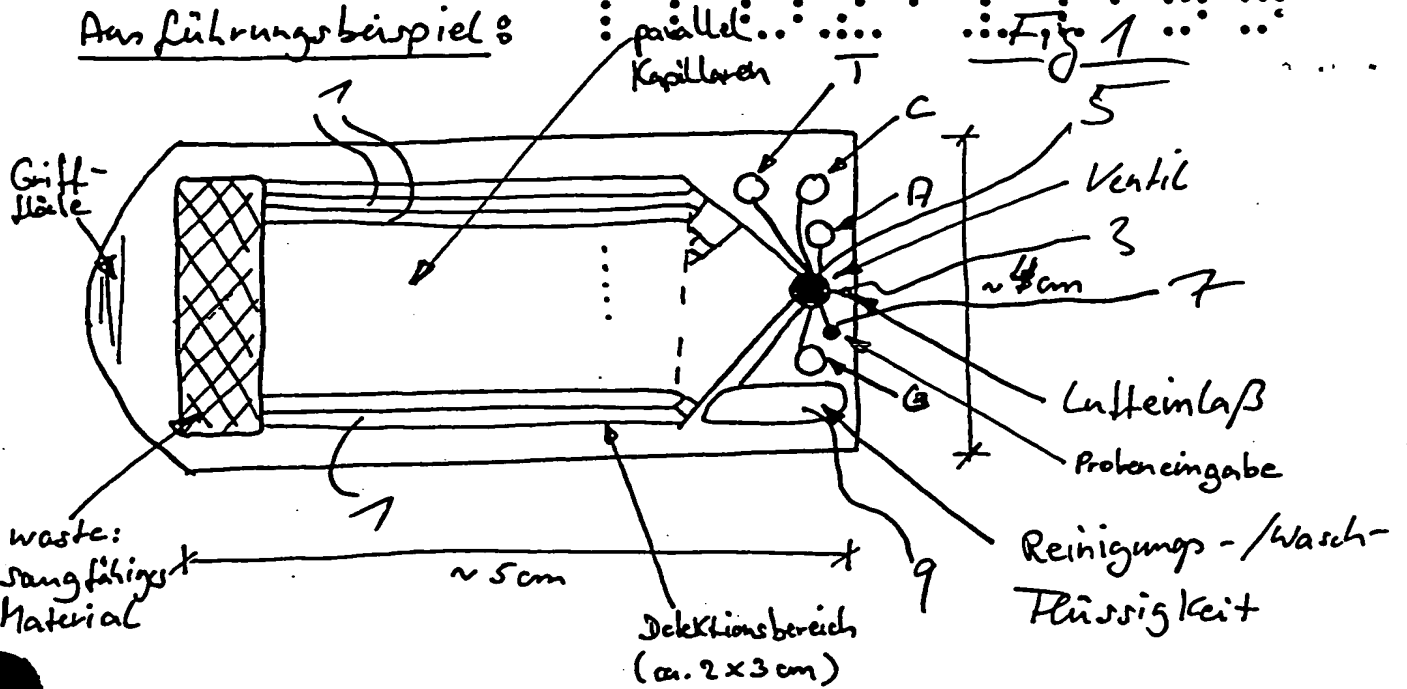
- 5 1. Träger für Analytbestimmungsverfahren umfassend eine Vielzahl von Kanälen, insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren immobilisiert ist.
- 10 2. Träger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er definierte Flächenbereiche mit jeweils gleichen Rezeptorspezies enthält.
- 15 3. Träger nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kanäle auf mindestens einer Trägeroberfläche angeordnet sind.
- 20 4. Träger nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Rezeptoren aus Nukleinsäuren und Nukleinsäureanaloga ausgewählt sind.
- 25 5. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach einem der Ansprüche 1 - 4, umfassend die Schritte:
 - 30 (a) Bereitstellen eines Trägerkörpers umfassend eine Vielzahl von Kanälen,
 - (b) Leiten von Flüssigkeit mit darin enthaltenen Rezeptoren oder Rezeptorbausteinen durch die Kanäle des Trägerkörpers und
 - (c) orts- oder/und zeitspezifisches Immobilisieren der Rezeptoren oder Rezeptorbausteine an jeweils vorbestimmten Positionen in den Kanälen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Immobilisieren durch Belichtung erfolgt.
- 5 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, umfassend den Aufbau des Rezeptors am Trägerkörper durch mehrere aufeinanderfolgende Immobilisierungsschritte von Rezeptorbausteinen.
8. Verwendung des Trägers nach einem der Ansprüche 1 - 4 in einem Verfahren zur Bestimmung von Analyten in einer biologischen Probe.

Zusammfassung

- 5 Es wird ein Träger für Analytbestimmungsverfahren angegeben, umfassend eine Vielzahl von Kanälen, insbesondere Kapillarkanälen, wobei in den Kanälen eine Vielzahl von unterschiedlichen Rezeptoren insbesondere durch Belichtung immobilisiert ist. Ferner wird ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Trägers beschrieben.

Ausführungsbeispiel:



G, A, C, T sind Reservoirs für die einzelnen Bienen (photoaktivierbar)

Weitere Beispiele für Kapillaranordnungen:

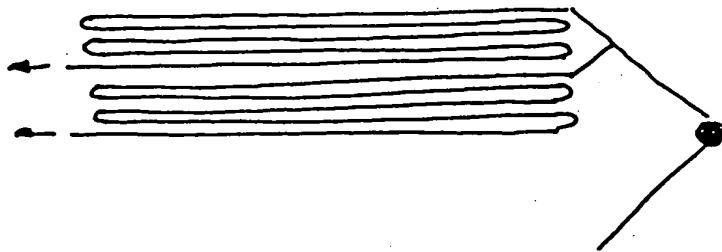
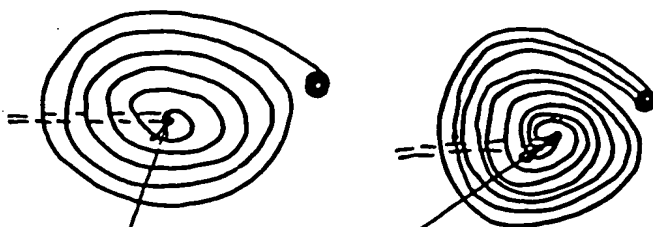


Fig. 2

1-m

Snakes

(auch ineinander schachtelbar)



1-m

parallele Spiralen

Abstopf beendet eine zusätzliche Ebene

14.02.11.99

Ausführungsbeispiel ①:

Fig. 3

